植物分类学报
第19卷 第3期 ACTA PHYTOTAXONOMICA SINICA 1981年8月

杨属植物的同工过氧化物酶*

胡志昂
(中国科学院植物研究所)

摘要

用聚丙烯酰胺凝胶板电泳分析了杨属全部5个组26种又3变种,及其他欧美杨无性系、人工种间杂种的阳极同工过氧化物酶。实验表明,叶柄和茎的酶谱相当稳定。整个酶谱分5组。c组酶为整个杨属所共有。b组只限白杨组各种,而且只有白杨组才缺乏a组各酶带。d组酶带最多、最复杂,充分显示出种的专一性。根据酶谱可以鉴定种、变种,甚至某些无性系。看来,杨属植物在形态进化的同时,发生了过氧化物酶的分歧。

分子遗传学认为,生物之千差万别,根本的差别在蛋白质的氨基酸顺序上,其信息储存于遗传物质脱氧核糖核酸的核苷顺序中[1]。这就是最初由 Crick 在1958年提出的著名的顺序假说和中心法则。同时,还预言将有蛋白质分类学的兴起[2]。20多年来,大量的蛋白质得到纯化并测定了氨基酸顺序。比较各类生物同源蛋白质的氨基酸顺序,可以看到两种生物亲缘越近,顺序越接近;亲缘越远,氨基酸的替换也越多。脊椎动物有齐全的化石资料,将其氨基酸替换率与地质年代对比,发现每种蛋白质在进化中氨基酸的替换有其特征性的稳定速率,反映了基因突变和固定有稳定速率,称为"进化钟"[3]。用各种蛋白质的顺序资料建造的分子系统树基本一致,说明顺序资料稳定而很少趋同。分子进化的稳定速率得到系统学家的重视。因为生物系统学中常用的形态特征,不能区分趋同还是同源,稳定性差,进化速度也不稳定。尤其在化石资料不足的情况下,很难确定分歧的时间,如有花植物起源问题[4]。Ramshaw 等(1972)[5] 根据20余种有花植物细胞色素c氨基酸顺序资料,提出有花植物可能类似于脊椎动物,虽然辐射状发展在近期,而起源远在古生代。而由顺序资料建造的分子系统树里各主要科的安排[4] 很不同于传统的有花植物系统树。很自然,引起经典分类学家的强烈反响[6]。显然有必要深入探索。不幸的是,要提纯足够数量的植物蛋白以供顺序分析是极端困难的,而且耗费巨大。事实上,世界上专攻植物蛋白质分类学的只限于个别实验室。同工酶(Isoenzyme 或 Isozyme)的发现和深入研究,为系统学家提供了一个相当简便的方法。同工酶是酶的多分子形式。它们具有一致的活性中心,因此催化同一个反应。但是活性中心附近的氨基酸顺序不同,赋予酶不同的静电荷、分子量或构型,因此在体内有不同的功能。只要将植物的提取液加入凝胶的样

* 我所董保华、王中仁,中国林业科学研究院梁彦、张绮文,内蒙古林业科学研究院童成仁,北京市农业科学院陶嘉奎,云南林业学院陈炳林,南京林产工业学院黄敏仁,湖北神农架林区红花朵林场许邦宪诸同志为本工作提供材料,特此致谢。

品槽里，在电场下提取物里不同的蛋白质因其静电荷、分子量及构型的不同而电泳到不同位置而分离开。如果把凝胶再浸入有过氧化氢和愈创木酚的缓冲液里，过氧化物酶(Peroxidase)能分解过氧化氢来氧化酚产生棕色高分子。凝胶中凡显出棕色带的地方表明存在该酶。不同位置的各带就是各个过氧化物酶同工酶，简称“同工过氧化物酶(Isoperoxidase)”。凝胶电泳，尤其是聚丙烯酰胺凝胶电泳有极高的分辨率，又结合专一的酶化学显色方法，因此分析同工酶通常可用粗提取液，不必事先纯化。

同工酶由结构基因编码。在进化中由最初的基因经基因重复和突变形成。因为脱氧核糖核酸的核苷顺序和蛋白质的氨基酸顺序有共线性关系，进化中形成的不同生物的不同基因组成会反映在同工酶谱上，构成同工酶谱的种属专一性。正如 Gottlieb (1977)[7] 所指出的，酶谱资料有如下优点：1. 避免趋同进化和性状相关；2. 酶带明确简单，较少主观性；3. 酶谱很少受环境影响；4. 不存在加权 (weighting) 问题。作为基因的标记，同工酶带通常呈共显性单孟德尔因子分离，遗传分析简单。而形态特征通常是多基因控制的所谓数量性状，很难分析。同工酶经过遗传确定，从酶谱资料可以确定植物天然群体(population) 中结构基因的数目、同一位点等位基因数及各自的频率。因此可以满意地研究群体基因频率变化这个进化过程[7,8]。

虽然多数酶都有同工酶，但植物界里报道最多的当推过氧化物酶。包括水稻[9]、小麦[10]、大麦[11]、燕麦[12]、玉米[13]、柑桔[14]、桑[15]等作物的同工过氧化物酶都进行了遗传分析，对于阐明其起源和进化起很大作用。

与形态特征、次生物质相比，酶固然是更为直接的基因产物，但毕竟不是基因的直接产物，有一个表达调节和修饰的问题。事实上，酶谱受到组织分化的巨大影响[16]。用同工酶进行系统学研究要注意这一点。

本文报道用同工过氧化物酶研究杨属的初步结果。

材料和方法

已分析的杨属各种、各变种按照王战和董世林系统分组列于表 1 。其他欧美杨无性系和其他人工种间杂种等列于表 2 [17]。

粗提取液的制备，除本文下面另外提出的方法外，都用新鲜或 −20℃ 冷冻的材料 1 克(鲜重)加 4 毫升含 20% 蔗糖的 pH5 的 0.2*M* 醋酸钠缓冲液，在研钵中研成糊状。两层纱布过滤所得滤液经 2000g 离心 10 分钟，上清液即为酶液。

聚丙烯酰胺凝胶板电泳用 Davis (1964)[18] 缓冲系统，但不用样品胶，样品直接加在间隔胶槽内。分离胶和间隔胶都用化学聚合，间隔胶浓度为 3%。凝胶板分 120×140 × 1.5 (毫米) 及 160 × 140 × 2 (毫米) 两种。在 240—300 伏电压下稳压电泳 2 — 4 小时。电泳后取出胶板，切去间隔胶部分后用愈创木酚法[19] 或联苯胺法[20] 显示同工过氧化物酶。Davis 缓冲系统[18]呈碱性，蛋白质带负电向阳极移动，所以本文报道的仅是阳极酶(Anodal isozyme)。本文附图全系照片。

表1 分析的杨属各种、各变种名录

中文名	学名	材料主要来源
Sect. Leuce Duby 白杨组		
银白杨	Populus alba L.	本所
新疆杨	P. alba var. pyramidalis Bge	本所
毛白杨	P. tomentosa Carr	本所
山　杨	P. davidiana Dode	本所
河北杨	P. hopeiensis Hu et Chow	本所
响叶杨	P. adenopoda Maxim.	南京中山植物园
Sect. Leucoides Spach. 大叶杨组		
椅　杨	P. wilsonii Schneid	湖北神农架林区
大叶杨	P. lasiocarpa Oliv.	南京林产工业学院
Sect. Tacamahaca Spach. 青杨组		
青　杨	P. cathayana Rehder	本所
川　杨	P. szechuanica Schneid	本所
梧桐杨	P. pseudomaximowiczii Wang et Tung	本所
冬瓜杨	P. purdomii Rehder	内蒙古林业科学研究院
小叶杨	P. simonii Carr	本所
滇　杨	P. yunnanensis Dode	云南林业学院
亚东杨	P. yatungensis Wang et Tung	本所
香　杨	P. koreana Rehder	内蒙古林业科学研究院
大青杨	P. ussuriensis Kom.	黑龙江森林植物园
小青杨	P. pseudo-simonii Kit.	黑龙江森林植物园
欧洲大叶杨	P. candicans Ait.	本所
小钻杨	P. xiaozhuanica Hsu et Ma	中国林业科学研究院
苦　杨	P. laurifolia Ledeb.	内蒙古林业科学研究院
Sect. Aigeiros Duby 黑杨组		
欧洲黑杨	P. niger L.	中国林业科学研究院
钻天杨	P. niger var. italica Koehne	本所
箭杆杨	P. niger var. thevestina Bean	内蒙古林业科学研究院
美洲黑杨	P. deltoides Marshall	中国林业科学研究院
北京杨	P. beijingensis Hsu et Liang	中国林业科学研究院
小黑杨	P. xiaohei Hwang	中国林业科学研究院
加　杨	P. canadensis Moench	本所
Sect. Turanga Bunge 胡杨组		
胡　杨	P. euphratica Oliv.	内蒙古林业科学研究院

表2 分析的欧美杨某些无性系及某些人工种间杂种等名录

中文名	学名	材料主要来源
晚花杨	Populus × euramerica (Dode) Guinier cv. "Serotina"	本所
莱比锡杨	P. × euramerica (Dode) Guinier cv. "Leipzig"	本所
卢加杨	P. × euramerica (Dode) Guinier cv."Lloydii"	本所
沙兰杨	P. × euramerica (Dode) Guinier cv. "Sacrau 79"	北京市农业科学院
意大利 214 杨	P. × euramerica (Dode) Guinier cv. "I-214"	中国林业科学研究院
河北新杨	P. hopeiensis × alba var. pyramidalis	北京市农业科学院
山新杨	P. davidiana × alba var. pyramidalis	北京市农业科学院
小山杨	P. simonii × davidiana	本所

结果和讨论

1. 不同提取剂对酶谱的影响。为了得到可重复的结果，首先试验不同提取剂对毛白杨叶柄酶谱的影响。结果表明(图略)：提取液的 pH 值、缓冲剂成份不影响酶谱，去污剂如 Triton X-100，还原剂抗坏血酸、半胱氨酸也很少影响。1 %的巯基乙醇剧烈地甚至完全抑制酶活性。这个抑制作用不限于杨属植株，甚至对结晶辣根酶也有直接的抑制作用。因此，那种认为为了防止酚失活植物蛋白而加入巯基乙醇来保护的做法并不适用于过氧化物酶。

2. 毛白杨各器官的酶谱。鉴于高等植物同工酶基因表达的组织专一性，我们分析了毛白杨白色幼根、棕色细根(直径约一毫米)、老根及茎、叶柄的酶谱。从图版 3:1 可以看出，随着根的衰老，酶谱变化极大(图版 3:1:4—7[1]).茎的酶谱变化很小(图版 3:1:2—3)，与叶柄很接近。实验又表明(图略)：短枝或长枝上每个成熟叶的叶柄有完全一样的酶谱，而且不随季节变化。所以一般选择成熟叶柄作为分析比较的材料。从若干产地收集的山杨、青杨、冬瓜杨、小叶杨等叶柄酶谱都相当接近。例外的是胡杨，它在形态和习性上是一个多型性 (polymorphic) 的种，它的酶谱也表现出多型性。性别的不同对酶谱没有显著影响。

3. 杨属同工过氧化物酶谱的种属专一性。图版 3:2，图版 3:3，图版 4:1，是杨属全部五个组 20 多种的叶柄酶谱，系联苯胺染色[21]。图版 4:2 是用愈创木酚显带的酶谱[20]。两种染色法所得图谱极为相似。唯一不同的是联苯胺染的银白杨酶比愈创木酚染色的多两条。用联苯胺显带，不仅灵敏度高，而且使银白杨谱和新疆谱的差别更加显著(图版 4:1:5—6)。为了便于分析比较，我们把整个阳极酶分为五组。第一组位于图谱最上方，迁移率最小，定为 Aa 组。第一个大写 A 字表示阳极酶，第二个小写字母表示酶带分组。Aa 组有 4 条带。 Aa1 在除白杨组外的其他杨树的茎里出现，大叶杨比较显著(图版 3:3:5)。Aa2 是大叶杨茎所特有。Aa3、Aa4 在除白杨组外的其他杨树的叶柄里都有(图版 3:2:6—15，图版 3:3:4—9，图版 4:1:7—18，图版 4:2:7—18)。第二组酶为白杨组特有。Ab1 迁移比 Aa4 略慢，叶柄里活性较低，幼根中显著(图版 3:1:4—5)。白杨组多数种叶柄有 Ab3，一个强带下有二个弱带(图版 3:2:4，图版 3:3:2)。响叶杨叶柄只有 Ab2(图版 4:1:1，图版 4:2:2)。第三组酶为整个杨属所共有。白杨组多数种的叶柄有 Ac1、响叶杨只有 Ac2(图版 4:1:1，图版 4:2:2)。胡杨组的胡杨，某些植株叶柄有 Ac3(图版 3:3:9)，有的植株没有 Ac3。大叶杨组的椅杨叶柄有 Ac2，茎有 Ac2、Ac3(图版 3:3:4、6)；大叶杨茎还有 Ac1(图版 3:3:5)。青杨和黑杨两个组，除了小叶杨有 Ac1 外，其余均只有 Ac2(图版 3:2:8—15，图版 3:3:7—8，图版 4:1:7—18，图版 4:2:7—18)。第四组酶 Ad，带最多、最复杂；充分表现出种间差别。迁移最快的第五组酶 Ae，仅见于山新杨等的根和愈伤组织中(照片略)。从整个酶谱看，在杨属内部，白杨组与其他组分歧比较显著。青杨组和黑杨组最接近，若以组为单位比较，两个间组没有酶谱差别。大叶杨组和胡杨组分析较少，

1) 即图版 3 中的图 1 的 4—7。余同。

需要更多的资料。白杨组内，响叶杨酶谱比较特殊。新疆杨酶谱接近银白杨，支持新疆杨作为变种的观点。从酶谱看，钻天杨也可能是欧洲黑杨变种(图版 4:1:14—15，图版 4:2:13—14)。箭杆杨酶谱(图版 3:2:14)与欧洲黑杨差别较大，它的起源值得研究。

4. 杨属种间天然和人工杂种的酶谱。图版 4:3 显示种间杂种及其亲本的酶谱。从图版 4:3 可见，小山杨既有小叶杨的 Aa，又有山杨的 Ab (图版 4:3:5—7)，小钻杨和小黑杨既有母本小叶杨的 Ac1，又有父本的 Ac2 (图版 4:3:8、9、11、12)。图版 4:3:8 的酶谱是小钻杨的一个无性系——群众杨。其他小钻杨无性系如小美 12、盖县 3 号、赤峰杨、八里庄杨、白城杨都有类似的酶谱。从图版 3:5 可以看出，小青杨(3、4 是雌株，5、6 是雄株)酶谱基本上是小叶杨和青杨酶谱的叠加。酶谱资料很直观地证明小青杨、白城杨、八里庄杨等的确是小叶杨和青杨或钻天杨的天然杂种。

5. 若干欧美杨无性系的酶谱。从已分析的 6 个无性系看，酶谱只有两种。一类和钻天杨相似，如加杨(图版 3:4:4)、晚花杨(图版 3:4:5)和莱比锡杨。所谓钻天杨雌株，牛春山等[18]鉴定为卢加杨的，也属这一类。另一类型包括沙兰杨 (图版 3:4:3) 和意大利 214 杨(图版 4:2:18)。这两类酶谱差别较大，可能有不同的起源。而属同一类型的可能有类似的起源。此外，图版 3:1:9—10 是河北毛白杨的叶柄酶谱和茎酶谱，基本上和毛白杨(原变种)一样，但 Ad 组多一条酶带。河北毛白杨经河南农学院园林系杨树研究组[21]鉴定为毛白杨的一个变种，酶谱也反映出这种变化。

综上所述，杨树植株叶柄及茎的阳极同工过氧化物酶相当稳定，具有显著的种属专一性。说明杨属在形态进化过程中，过氧化物酶也发生了分歧。尽管杨属各种间极易反复杂交，形态性状不够稳定，但酶谱资料基本上支持了形态分类。我们正继续收集和分析杨属其余种类，并通过种间杂种进行遗传分析，可能对杨属起源和演化得到更多的证据。

参　考　文　献

[1] Stent et Calendar, 1978: Molecular Genetics. 2rd ed. Freeman & Company.

[2] Crick, 1958: On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**: 138.

[3] Wilson et al, 1977: Biochemical evolution. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 573.

[4] Boulter, 1976: The evolution of plant proteins with special reference to higher plant cytochrome C. Commentaries in Plant Science ed: Smith. p. 77.

[5] Ramshaw et al, 1972: The time of origin of the flowering plants determined by using amino acid sequence data of cytochrome C. *New Phytol.* **71**:773.

[6] Cronquist, 1976: The taxonomic significance of the structure of plant proteins: a classical taxonomist's view. *Brittonia,* **28**:1.

[7] Gottlieb, 1977: Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **64**: 161.

[8] Brown, 1978: Isozyme, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* **52**:145.

[9] Shahi et al, 1969: Analysis of genes controlling peroxidase isozymes in Oryza sativa and O. perennis. *Jap. J. Genet.* **44**:321.

[10] Benito et Perez de la Vega, 1979: The chromosomal location of peroxidase isozymes of the wheat kernel. *Theor. Appl. Genet.* **55**:73.

[11] Felder, 1976: Genetic control of four cathodal peroxidase isozymes in barley. *J. Hered.* **67**:39.

[12] Smith, 1972: The inheritance of two peroxidase in oat leaves. *J. Hered.* **63**:317.

[13] Brown et Allard, 1969: Inheritance of differences among the inbred parents of a reciprocal recurrent selection population of maize. *Crop Sci.* **9**:72.

[14] Esen et Soost, 1976: Peroxidase polymorphism in Citrus. *J. Hered.* **67**:199.

[15] Hisashi et Naganuna, 1979: Inheritance of peroxidase isozymes in mulberry (Morus ssp). *Euphytica* **28**:73.

[16] Scandalios, 1974: Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Pl. Physiol*, **25**:225.

[17] 牛春山等，1980：陕西杨树，陕西科学技术出版社。

[18] Davis, 1964: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals N.Y. Acad. Sci.* **121**:404.

[19] Mader et al.,1975: Lokalisation der Peroxidase-Isoenzymes in Protoplasten und Zellwanden von Nicotiana tabacum L. *Planta* **122**:259.

[20] Schrauwen, 1966: Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamid-Saulchen. J. Chromatog. **23**: 178.

[21] 河南农学院园林系杨树研究组，1978：毛白杨类型的研究，中国林业科学 1978：14.

ISOPEROXIDASES OF POPULUS PLANTS

Hu Zhi-ang

(*Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*)

Abstract

Isoperoxidases of 26 species and 2 varieties, belonging to 5 sections of *Populus*, were analysed by means of polyacrylamide gel slab electrophoresis. Experimental evidences indicate that the zymograms of petioles are stable. Whole anodal isozymes may be divided into 5 groups; a.b.c.d.e. Every species of *Populus* shared the c group isozymes. The b group is limited within the section *Leuce*, and only in this section, the a group enzymes are absent. The d group is very complicated, and fully expressed the species-specificity. Base on their specific zymograms, it is easy to distinguish one species from the others, sometimes, we can characterize the varieties, even some clones. It seems that, in the course of morphological evolution of *Populus*, the divergence of their isoperoxidases also occurred.

图版说明 (Explanation of plates)

图版 3 (plate 3)

图 1 毛白杨不同器官的过氧化物酶谱。

Fig. 1, Peroxidase zymograms of several organs of Populus tomentosa.

1,8.叶柄 petiole; 2.当年枝条 annual stem; 3. 多年生老枝 perennial stem; 4. 幼根 young root; 5. 棕色细根 brown fine root; 6.直径5毫米左右的根 root (ca. 5mm diameter); 7.老根 old root; 9.河北毛白杨叶柄 petiole (P. tomentosa var.); 10.河北毛白杨当年枝条 annual stem (P. tomentosa var.).联苯胺染色

图 2 杨属某些种叶柄的过氧化物酶。

Fig. 2, Petiole peroxidases of some Populus species.

1—2.银白杨 (P. alba); 3.毛白杨 (P. tomentosa); 4.河北杨 (P. hopeiensis); 5.响叶杨 (P. adenopoda); 6.胡杨 (P. euphratica); 7.椅杨 (P. wilsonii); 8.青杨 (P. cathayana); 9.小叶杨 (P. simonii); 10.大青杨 (P. ussuriensis); 11. 香杨 (P. koreana); 12.亚东杨 (P. yatungensis); 13. 苦杨 (P. laurifolia); 14.箭杆杨 (P. niger var. thevest ina); 15.钻天杨 (P. niger var. italica)。联苯胺染色。

图3　杨属植株同工过氧化物酶的分组。

Fig. 3, Groups of Populus isoperoxidases.

1.银白杨 (P. alba); 2.河北杨 (P. hopeiensis); 3.响叶杨 (P. adenopoda); 4.椅杨 (P. wilsonii); 5.大叶杨 (P. lasiocarpa)茎; 6.椅杨 (P. wilsonii) 茎; 7.小叶杨 (P. simonii); 8.钻天杨 (P. niger var. italica); 9.胡杨 (P. euphratica); 10.白柳 (Salix alba)。联苯胺染色。

图4　欧美杨某些无性系的过氧化物酶谱。

Fig. 4, Peroxidase zymograms of some clones of Populus × euramericana.

1.钻天杨 (P. niger var. italica); 2.欧洲黑杨 (P. niger); 3.沙兰杨 (P. × euramerica cv. 'Sacrau 79'); 4.加杨 (P. canadensis); 5.晚花杨 (P. × euramerica cv. 'Serotina'); 6.美洲黑杨 (P. deltoides)。联苯胺染色。

图5　小青杨及其亲本的同工过氧化物酶。

Fig. 5, Isoperoxidases of Populus pseudo-simonii and it parents.

1—2.小叶杨 (P. simonii); 3—4.小青杨 (P. pseudo-simonii ♀); 5—6.小青杨 (P. pseudo-simonii ♂); 7.青杨 (P. cathayana)。联苯胺染色。

图版 4 (plate 4)

图1　杨属某些种的过氧化物酶谱。

Fig. 1, Peroxidase zymograms of some Populus species.

1.响叶杨 (P. adenopoda); 2.河北杨 (P. hopeiensis); 3.山杨 (P. davidiana); 4.毛白杨 (P. tomentosa); 5.新疆杨 (P. alba var. pyramidalis); 6.银白杨 (P. alba); 7.青杨 (P. cathayana); 8.川杨 (P. szechuanica); 9.冬瓜杨 (P. purdomii); 10.滇杨 (P. yunnanensis); 11.梧桐杨 (P. pseudo-maximowiczii); 12.小叶杨 (P. simonii); 13.欧洲大叶杨 (P. candicans); 14.钻天杨 (P. niger var. italica); 15.欧洲黑杨 (P. niger); 16.沙兰杨 (P. × euramerica cv. 'Sacrau 79'); 17.加杨 (P. canadensis); 18.美洲黑杨 (P. deltoides)。联苯胺染色。

图2　杨属某些种的过氧化物酶谱。

Fig. 2, Peroxidase zymograms of some Populus species.

1.河北杨 (P. hopeiensis); 2.响叶杨 (P. adenopoda); 3.山杨 (P. davidiana); 4.毛白杨 (P. tomentosa); 5.新疆杨 (P. alba var. pyramidalis); 6.银白杨 (P. alba); 7.青杨 (P. cathayana); 8.川杨 (P. szechuanica); 9.冬瓜杨 (P. purdomii); 10.梧桐杨 (P. pseudo-maximowiczii); 11.小叶杨 (P. simonii); 12.欧洲大叶杨 (P. candicans); 13.钻天杨 (P. niger var. italica); 14.欧洲黑杨 (P. niger); 15.美洲黑杨 (P. deltoides); 16.空白 (Blank); 17.沙兰杨 (P. × euramerica cv. 'Sacrau'); 18.意大利214杨 (P. × euramerica cv. 'I-214')。愈创木酚染色。

图3　杨属某些人工杂种的同工过氧化物酶。

Fig. 3, Isoperoxidases of some artificial Populus hybrids.

1.河北杨 (P. hopeiensis); 2.河北新杨 (P. hopeiensis × alba var. pyramidalis); 3.新疆杨 (P. alba var. pyramidalis); 4.山新杨 (P. davidiana × alba var. pyramidalis); 5.山杨 (P. davidiana); 6.小山杨 (P. simonii × davidiana); 7.小叶杨 (P. simonii); 8.小钻杨 (P. xiaozhuanica); 9.钻天杨 (P. niger var. italica); 10.旱柳 (Salix matsudana); 11.小黑杨 (P. xiaohei); 12.欧洲黑杨 (P. niger); 13.加杨 (P. canadensis); 14.美洲黑杨 (P. deltoides)。愈创木酚染色。